

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

DÉBORA BUBLITZ ANTON

CARACTERIZAÇÃO DO P5CS (DELTA 1-PIRROLINA-5-CARBOXILATO SINTASE) EM *Eugenia uniflora* L. E SEU PERFIL DE EXPRESSÃO SOB ESTRESSE HÍDRICO

**PORTO ALEGRE
2018**

DÉBORA BUBLITZ ANTON

CARACTERIZAÇÃO DO P5CS (DELTA 1-PIRROLINA-5-CARBOXILATO SINTASE) EM *Eugenia uniflora* L. E SEU PERFIL DE EXPRESSÃO SOB ESTRESSE HÍDRICO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Orientadora: Andreia Carina Turchetto Zolet

**PORTO ALEGRE
2018**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética da UFRGS. O trabalho teve financiamento do CNPq, da Pró-Reitoria de Pesquisa e do Instituto de Biociências - UFRGS – Brasil.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Vanice e Darci, e aos meus irmãos, Eduardo e Marcelo, que me apoiaram e me incentivaram durante toda a jornada da graduação. Muito obrigada por tornarem este sonho possível.

A minha orientadora Andreia pela oportunidade, confiança e ensinamentos.

A Lúcia, Franceli, Nicole, Felipe e Frank que de alguma forma ajudaram e contribuíram para este trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos.

Aos meus colegas e amigos de graduação pelo companheirismo de todos os dias. As minhas amigas de Lajeado, que estiveram presentes durante todos esses anos. Muito obrigada pela amizade e apoio.

A Viviane, que desde que nos tornamos colegas de curso está presente na minha vida. Obrigada por todas as noites de estudo, jantares, risadas, duplas em trabalhos e entre outros momentos que passamos juntas.

Aos meus colegas da Bioinformática, Leonardo, Maiara e Ana, pela amizade e convívio durante as aulas. Sem vocês não teria sido possível enfrentar todos os desafios que passamos.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

Estresses abióticos podem afetar o crescimento e desenvolvimento das plantas. O gene P5CS (delta 1-pirrolina-5-carboxilato sintase) codifica uma enzima bifuncional, responsável por catalisar uma reação limitante da biossíntese de prolina, a qual é conhecida por ser um osmoprotetor, relacionada com a tolerância a estresses abióticos em plantas, tais como a seca e salinidade. *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) é uma espécie de planta que ocorre naturalmente na Mata Atlântica, podendo ser encontrada em diferentes ambientes, tais como matas ciliares e restinga. Esses ambientes são bastante contrastantes em termos de clima, composição de solo, aporte de nutrientes e disponibilidade de água. A plasticidade adaptativa a esses ambientes heterogêneos faz desta espécie um modelo natural para o entendimento sobre mecanismos de adaptação e respostas a estresses ambientais. Tais mecanismos podem estar relacionados à presença de genes de respostas a estresses ambientais como, por exemplo, o gene P5CS. Entretanto, informações sobre o gene P5CS e o seu papel na tolerância a estresses abióticos em *E. uniflora* ainda não são conhecidas. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar o gene P5CS de *E. uniflora* (EuniP5CS) e avaliar o padrão de expressão desse gene em plantas sob estresse hídrico. Para isso, plantas provenientes de ambientes de Restinga no Rio de Janeiro e de Mata Ciliar no Rio Grande do Sul foram submetidas a diferentes tempos de tratamento por escassez de água. Análises filogenéticas indicaram que o gene EuniP5CS é um membro da família gênica P5CS e possui alta similaridade com P5CS de *Eucalyptus grandis* e de outras espécies de plantas. Análises dos parâmetros fisiológicos das plantas sob condições de estresse demonstraram que as plantas de ambos os ambientes (restinga e mata ciliar) respondem fisiologicamente da mesma forma ao estresse, tendo seus potenciais hídricos e condutâncias estomáticas diminuídos aos 14 dias de estresse. Análises de expressão por RT-qPCR revelaram que a expressão do EuniP5CS é aumentada durante o estresse hídrico nas plantas tratadas provenientes da restinga. Comparando a expressão do gene EuniP5CS nas plantas controle provenientes da restinga e mata ciliar, observou-se maior expressão desse gene nas plantas provenientes da mata ciliar do que naquelas provenientes da restinga. Os resultados sugerem que o gene EuniP5CS caracterizado nesse estudo pode desempenhar um papel importante em processos adaptativos dessa espécie nos diferentes ambientes. Estudos funcionais do gene P5CS em *Eugenia uniflora* serão importantes para o entendimento do papel do gene e da tolerância a estresses relacionado a prolina nessa espécie.

Palavras-chave: Prolina, P5CS; pitanga; estresse hídrico; adaptação.

ABSTRACT

Abiotic stresses may affect growth and development of plants. P5CS (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthase) gene encodes a bifunctional enzyme responsible for catalyzing a limiting reaction of proline biosynthesis, which is known to be an osmoprotective that is related to tolerance to abiotic stresses, such as drought and salinity. *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) is a plant species native of Atlantic Forest, occurring in distinct environments like riparian forests in Rio Grande do Sul and restinga regions in southeastern and northeastern Brazil. These are contrasting environments in terms of climate, composition of soil, nutrient supply and water availability. Adaptive plasticity to these heterogeneous environments makes this species a natural model for understanding adaptation mechanisms and responses to environmental stresses. Such mechanisms may be related to the presence of genes for responses to environmental stresses, such as the P5CS gene. However, information on the P5CS gene and its role in abiotic stress tolerance in *E. uniflora* are not yet known. Here, we goal to characterize the P5CS gene of *E. uniflora* (EuniP5CS) and evaluate its expression pattern under water stress in plants from restinga environments and riparian forest. Phylogenetic analyzes indicated that the EuniP5CS gene is a member of P5CS gene family with high similarity to P5CS genes from *Eucalyptus grandis* and other plant species. Analysis of physiological parameters of plants under the stress condition demonstrated that plants from resting and riparian forest responded in the same way to stress, having their water potentials and stomatal conductances decreased at 14 days of stress. Expression analyzes by RT-qPCR revealed that the expression of EuniP5CS is increased during water stress in the treated plants from restinga. Comparative analysis of EuniP5CS expression in control plants from riparian forest and restinga demonstrated that EuniP5CS from riparian forest present higher expression than those from restinga. The results suggest that EuniP5CS gene characterized in this study may play an important role in adaptation processes of this species in such distinct environments. Future functional studies of the P5CS gene in *Eugenia uniflora* will be important to better understand the role of the gene and the proline-related stress tolerance in this species.

Keywords: Proline, P5CS; pitanga; drought stress; adaptation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de distribuição da <i>Eugenia uniflora</i>	9
Figura 2. Possíveis danos causados nas plantas por estresse hídrico.....	12
Figura 3. Rota proposta para a biossíntese de prolina em plantas.....	13
Figura 4. Esquema de distribuição das plantas durante o experimento de seca.....	18
Figura 5. Estrutura gênica do P5CS.....	22
Figura 6. Alinhamento múltiplo de sequências proteicas do gene P5CS.....	23
Figura 7. Árvore filogenética do gene EuniP5CS e de P5CSs de outras espécies.....	24
Figura 8. Peso das plantas inicial e final.....	25
Figura 9. Condutância estomática das plantas durante o experimento.....	26
Figura 10. Potencial hídrico das plantas.....	28
Figura 11. Valores das médias de estabilidade de expressão (M) calculadas pelo geNorm....	29
Figura 12. Análise por RT-qPCR da expressão do gene EuniP5CS nas plantas controle do RJ e RS.....	30
Figura 13. Análises por RT-qPCR da expressão do gene EuniP5CS durante os períodos do estresse hídrico.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES

ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ATP	Trifosfato de Adenosina
P5CS	Delta 1-pirrolina-5-carboxilato sintase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementar)
RNA	Ácido Ribonucleico
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Fase de leitura aberta)
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
M	Molar
pH	Potencial Hidrogeniônico
g	Gramas
MPa	Megapascal
pb	Pares de Bases
s	Segundos
min	Minutos
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 A <i>Eugenia uniflora</i> L.....	9
1.2 Adaptação a estresses ambientais.....	11
1.3 A via de biossíntese de Prolina e o gene P5CS.....	12
1.4 Caracterização do gene P5CS <i>in silico</i>	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos Gerais.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 JUSTIFICATIVA	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Identificação e análise da sequência do gene P5CS de <i>Eugenia uniflora</i>	17
4.2 Plantas e condições do experimento.....	17
4.3 Parâmetros Fisiológicos.....	18
4.4 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	18
4.5 Quantificação da expressão do gene EuniP5CS via PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	20
4.6 Seleção dos genes de referência para análises de expressão por RT-qPCR.....	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 Caracterização e análises da sequência EuniP5CS.....	22
5.2 Análises dos parâmetros fisiológicos.....	24
5.2.1 Peso das plantas.....	24
5.2.2 Condutância estomática.....	26
5.2.3 Potencial Hídrico.....	27
5.3 Análise do padrão de expressão do gene P5CS de <i>E. uniflora</i> por RT-qPCR.....	28
5.3.1 Seleção de genes de referência.....	28
5.3.2 Perfil de expressão do EuniP5CS em condições de estresse hídrico.....	29
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	33
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 A *Eugenia uniflora* L.

A planta nativa *Eugenia uniflora* L., popularmente conhecida no Brasil como pitangueira, pertence à família Myrtaceae e está muito presente na vegetação costeira brasileira (MARGIS et al., 2002), bem como em matas ciliares no extremo Sul da Mata Atlântica. *Eugenia uniflora* é bastante versátil e cresce em uma variedade de regiões fitogeográficas no domínio da Mata Atlântica (SALGUEIRO et al., 2004), ocorrendo em regiões com diferentes condições de solo e clima, desde o estado do Rio Grande do Sul até o estado de Pernambuco no Brasil, bem como no nordeste da Argentina, Uruguai e Paraguai (ROTMAN, 1995). Por crescer naturalmente nesses ecossistemas com condições ambientais diferentes, essa espécie também apresenta algumas características fenotípicas que diferem entre um ambiente e outro. Na vegetação da planície costeira arenosa (Restinga) no Sudeste e Sul do Brasil ela cresce como arbusto ou árvore pequena (ARAUJO et al., 1998; DILLENBURG; WAECHTER; PORTO, 1993), enquanto que nas encostas da Mata Atlântica aparece na vegetação de mata ciliar como árvore (BARROSO; MARQUES, 1997). A figura 1 mostra no mapa esses dois ecossistemas em que a *E. uniflora* está presente e também imagens de como as plantas se apresentam nesses ambientes.

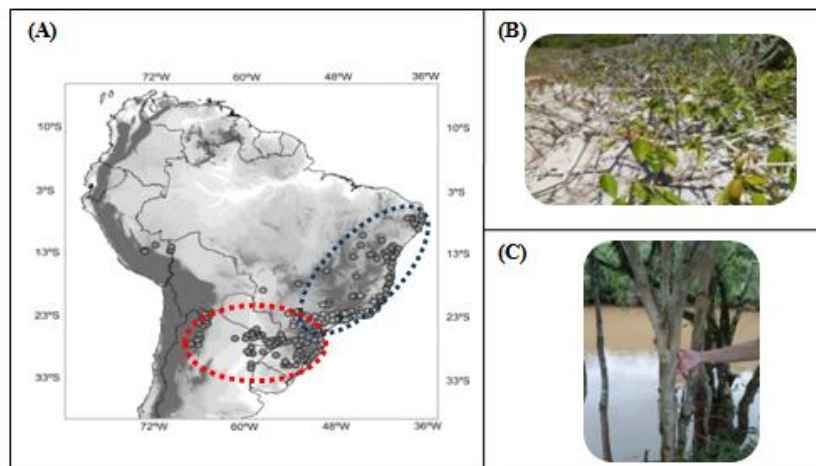


Figura 1. Área de distribuição da *Eugenia uniflora*. (A) Os círculos no mapa indicam as regiões onde *E. uniflora* está presente. O círculo pontilhado vermelho representa as plantas em regiões de Mata Ciliar e o círculo pontilhado azul representa as plantas em regiões de Restinga. (B) Foto do ambiente onde as plantas vivem no Rio de Janeiro (Restinga), com solos arenosos, baixa disponibilidade de água e alta salinidade. (C) Foto do ambiente onde as plantas vivem no Rio Grande do Sul (Mata Ciliar), com solos orgânicos e grande disponibilidade de água e nutrientes.

Sabe-se que o ambiente de Restinga possui condições ambientais que dificultam o crescimento de plantas, como solos pobres em nutrientes, solo arenoso e influência permanente da salinidade (SCARANO, 2009). Já na vegetação de mata ciliar, existe um ambiente composto por várias comunidades/habitats de plantas distintas que encontram melhores condições de crescimento, como maior disponibilidade de água e solos mais férteis (RODRIGUES; NAVE, 2004). Um estudo recente de filogeografia e demografia usando marcadores neutros sugeriu que existem histórias evolutivas distintas nas populações de *E. uniflora* do sul ao norte da distribuição (TURCHETTO-ZOLET et al., 2016). As populações do Sul da Mata Atlântica se mostraram estáveis ao longo do tempo e com uma maior diversidade genética do que as populações do Norte da Mata Atlântica, as quais mostraram crescimento populacional recente. Isso sugere que as populações respondem de forma diferente aos efeitos e processos ecológicos passados. Os resultados desse trabalho chamam a atenção para o entendimento de processos adaptativos nessa espécie.

E. uniflora é uma espécie de planta nativa do Brasil que possui grande importância ecológica, sendo importante nas comunidades vegetais onde habita, servindo de alimento para diversas espécies de pássaros e para recuperação de áreas degradadas (ALMEIDA; FARIA; SILVA, 2012). Além disso, devido às características de seus frutos e folhas, ricos em vitaminas e óleos essenciais, apresenta grande potencial para exploração econômica (ALMEIDA; FARIA; SILVA, 2012). Devido a esses óleos essenciais presentes, ela pode ser utilizada na produção de cosméticos e na medicina popular, atuando como anti-diarréicos, diuréticos, antifebril, anti-reumáticos, entre outros (COSTA et al., 2013) Genótipos que possuem alto potencial produtivo e boas características agrônômicas têm sido selecionados pela Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, no Nordeste brasileiro (BEZERRA; SILVA JUNIOR; LEDERMAN, 2008). No Brasil, existem áreas de plantio comercial de *E. uniflora* no estado do Pernambuco, demonstrando o crescimento da importância econômica da espécie (BEZERRA et al., 2002; BEZERRA; SILVA JUNIOR; LEDERMAN, 2008). Apesar desse interesse econômico e ecológico, *E. uniflora* ainda é pouco estudada em relação a sua plasticidade adaptativa. A sua história evolutiva e seu crescimento em ambientes heterogêneos torna essa espécie um modelo natural para entender mecanismos de adaptação e respostas ao estresse ambiental. Os dados de variabilidade genética de *E. uniflora* são importantes para ações que visam o melhoramento genético e a conservação da espécie, tendo em vista o cultivo e exploração comercial.

1.2 Adaptação a estresses ambientais

Os estresses abióticos aos quais as plantas estão sujeitas ao longo de suas vidas trazem muitas vezes efeitos negativos, entre eles a mudança do crescimento e desenvolvimento da planta (AROCA, 2012). Entre esses estresses, encontram-se a seca, alta salinidade e condições de temperaturas extremas que afetam as plantas devido a uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas e moleculares por qual elas passam (MICKELBART; HASEGAWA; BAILEY-SERRES, 2015; WANG et al., 2001). Sendo a seca um dos maiores fatores limitantes no crescimento das plantas, entender os mecanismos de respostas que elas desenvolvem é de extrema importância. A adaptação ou tolerância a estresses ambientais são geralmente regulados por processos celulares. Os osmoprotetores têm sido relacionados com mecanismos de proteção que as plantas desenvolvem para lidar com os estresses abióticos, sem perturbar o metabolismo da planta (MOLINARI et al., 2004). Por exemplo, sob estresse por seca, as plantas podem aumentar o potencial osmótico das suas células sintetizando e acumulando osmólitos compatíveis, tais como a prolina (DELAUNEY; VERMA, 1993), a qual desempenha um papel importante na osmoproteção e crioproteção em diversos organismos, tais como bactérias, plantas e insetos (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008; MOLINARI et al., 2004). Estudos provaram a eficácia do ajuste osmótico por osmoprotetores usando plantas transgênicas que acumularam maiores concentrações de prolina (GUAN et al., 2014; CHOUDHARY; SAIRAM; TYAGI, 2005; KISHOR et al., 1995).

As plantas sob estresse por seca desequilibram o balanço entre antioxidantes e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando o estresse oxidativo (Figura 2). Além disso, os estômatos se fecham, diminuindo o conteúdo de CO₂ interno das folhas, a taxa de fotossíntese e o potencial hídrico (AROCA, 2012; VERSLUES et al., 2006). Dessa forma, as plantas podem sobreviver a esse estresse estimulando uma série de mudanças fisiológicas e bioquímicas, entre elas o mantimento do turgor das células, eliminando ROS que são produzidas e reduzindo a evaporação de água com o acúmulo de osmólitos e fechamento dos estômatos (SEKI et al., 2007; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). O acúmulo de osmólitos como a prolina, sacarose, poliaminas, manitol e pinitol, contribui para a manutenção do equilíbrio hídrico das plantas sob estresse e protege proteínas, enzimas e membranas celulares (ASHRAF et al., 2011; MARIJUAN; BOSCH, 2013). O ajuste osmótico é um dos melhores mecanismos fisiológicos para a manutenção da turgescência celular das plantas que estão sob condições de estresse hídrico (MARIJUAN; BOSCH, 2013).

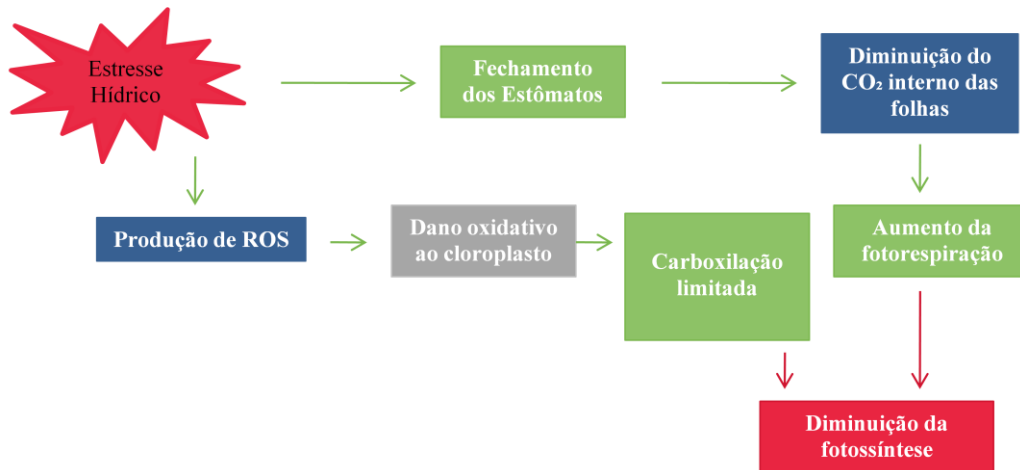


Figura 2. Possíveis danos causados nas plantas pelo estresse hídrico. A seca perturba o balanço entre a produção de ROS e a defesa pelas enzimas antioxidantes, causando o acúmulo de ROS, que induz o estresse oxidativo. Com o fechamento dos estômatos, o CO₂ interno diminui, fornecendo mais elétrons para a produção de ROS e também promovendo o aumento da fotorespiração e declínio da taxa de fotossíntese. Figura baseada em AROCA, 2012.

Um estudo recente demonstrou que *E. uniflora* apresenta uma rápida resposta ao estresse hídrico porque em condições de seca diminui sua atividade fotossintética, aumenta o controle dos estômatos, reduz o conteúdo de água na folha e aumenta o acúmulo de osmólitos (como a prolina, por exemplo) (TOSCANO et al., 2016). Desta forma, o fato de *E. uniflora* ocorrer em diferentes condições ambientais a torna uma espécie interessante para se estudar os genes envolvidos na síntese de prolina e também na adaptação a estresses ambientais.

1.3 A via de biossíntese de Prolina e o gene P5CS

O aminoácido prolina é um dos solutos celulares mais importantes e em altas concentrações não só participa do ajuste osmótico, mas também pode proteger as plantas de estresses ambientais (TOSCANO et al., 2016; FILIPPOU et al., 2014; MAGGIO et al., 2002). O acúmulo de prolina em plantas tem sido reportado durante condições de estresses abióticos, como seca, alta salinidade, alta luminosidade e estresse oxidativo (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010). Dentre os vários papéis que a prolina exerce, está a proteção de processos celulares devido ao auxílio na remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MATYSIK et al., 2002; SMIRNOFF; CUMBES, 1989); a estabilização de proteínas, membranas e estruturas subcelulares devido ao equilíbrio dos osmólitos extracelulares e intracelulares (MATYSIK et al., 2002); a atuação como estoque de energia e potencial reducional (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010); e o auxílio na proteção de enzimas e estruturas celulares (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008; CHINNUSAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005). Em condições de estresse hídrico, por exemplo, a biossíntese de prolina é ativada e seu

catabolismo sofre repressão, enquanto que durante a reidratação acontece a situação oposta (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010).

A via de biossíntese de prolina foi primeiramente elucidada em bactérias e tem início com a fosforilação do ácido glutâmico dependente de ATP pela atividade da enzima γ -glutamil quinase (γ -GK - EC 2.7.2.11), codificada pelo gene *proB*. O produto de γ -GK é reduzido para semialdeído glutâmico (GSA) pela γ -glutamil fosfato redutase (γ -GPR-EC1.2.1.41), codificada pelo gene *proA* (MAHAN; CSONKA, 1983; ORSER et al., 1988) GSA cicliza espontaneamente para formar delta1-pirrolina-5-carboxilato (P5C) que é reduzido para prolina pela enzima P5C redutase (P5CR - EC1.5.1.2, codificada pelo gene *proC*) (HU; DELAUNEY; VERMA, 1992; IGARASHI et al., 1997). Em plantas, a biossíntese de prolina se assemelha a via bacteriana e utiliza o ácido glutâmico ou ornitina como substratos, sendo o ácido glutâmico preferido em condições de estresse (DELAUNEY; VERMA, 1993). Este processo também é conservado em outros organismos. A enzima bifuncional P5CS (delta 1-pirrolina-5-carboxilato sintase) catalisa as duas primeiras etapas da síntese da prolina em plantas (Figura 3). P5CS exerce tanto a atividade de γ -glutamil quinase, como a atividade de γ -glutamil fosfato redutase (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010).

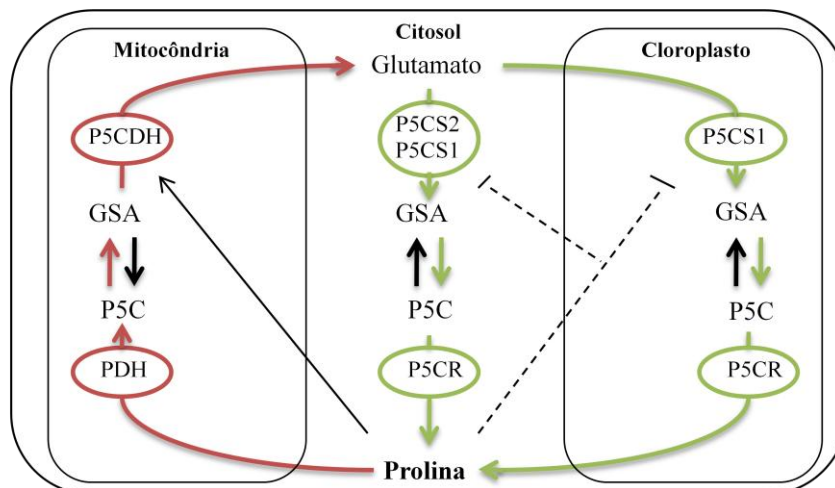


Figura 3. Rota proposta para a biossíntese de prolina em plantas. Os dados foram obtidos usando *Arabidopsis*, porém podem ser validados para outras espécies. A via de produção de prolina está marcada com linhas verdes e a via de catabolismo em linhas vermelhas. Nas células meristemáticas e embrionárias, a biossíntese ocorre no citosol e é mediada pelas enzimas P5CS e P5CR. Sob condições de estresse, P5CS1 se acumula nos cloroplastos levando a uma maior produção de prolina. A degradação de prolina ocorre nas mitocôndrias, onde a prolina é oxidada para P5C e glutamato por meio da ação de PDH e P5CDH. Figura baseada em SZABADOS; SAVOURÉ, 2010.

Na maioria das espécies de plantas, P5CS é codificada por dois genes (P5CS1 e P5CS2) (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010; TURCHETTO-ZOLET; MARGIS-PINHEIRO; MARGIS, 2009), resultante de eventos de duplicação evolutivas independentes. Entretanto, as

enzimas codificadas por estes dois genes duplicados, estudadas até o momento, parecem desempenhar funções não redundantes e seus genes apresentam diferentes padrões de expressão (SILVA-ORTEGA et al., 2008; FARZANEH; JAZI; MOTAMED, 2005; GINZBERG et al., 1998). O P5CS tem sido isolado de plantas e estudos com esse gene têm sido feitos para entender o papel que desempenha em plantas. Estudos já demonstraram que o aumento da enzima bifuncional P5CS sob estresses ambientais pode acumular prolina nas plantas, favorecendo o ajuste osmótico (CHOUDHARY; SAIRAM; TYAGI, 2005; PENG; LU; VERMA, 1996; KISHOR et al., 1995).

1.4 Caracterização do gene P5CS *in silico*

A maioria dos estudos de caracterização da sequência do gene P5CS de espécies de plantas que se encontram na literatura são derivados de experimentos com clonagem molecular (WANG et al., 2017; ZHOU et al., 2016; CAO et al., 2015; ZHUANG et al., 2011). Entretanto, com as novas tecnologias oferecidas pela bioinformática é possível atualmente realizar essa caracterização *in silico*, como já foi vista em outro estudo (RAMADAN; HASSANEIN, 2014), utilizando o transcrito ou o genoma para a predição da sequência do gene.

Os avanços em genômica e tecnologia de sequenciamento de DNA (*Next Generation Sequencing* - NGS) estão revolucionando o entendimento sobre mecanismos evolutivos e moleculares. Embora projetos genoma de espécies nativas ainda sejam escassos em espécies não modelos, os dados de transcrito agora podem ser facilmente produzidos, o que tem facilitado a identificação de genes candidatos de resposta às variações ambientais em muitas espécies nativas. O transcriptoma de *E. uniflora* foi recentemente publicado (GUZMAN et al., 2014) e serve como base para a identificação e caracterização de genes nessa espécie como, por exemplo, o gene P5CS. A caracterização deste gene nas diferentes linhagens desta espécie será de grande relevância para o entendimento de mecanismos moleculares de adaptação aos ambientes contrastantes em que a *E. uniflora* é encontrada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo do presente estudo é identificar e caracterizar P5CS (delta 1-pirrolina-5-carboxilato sintase) de *Eugenia uniflora* e verificar seu perfil de expressão sob condições de estresse hídrico.

2.2 Objetivos Específicos

- a. Identificar sequências de P5CS no transcrito de *Eugenia uniflora* por meio de análises *in silico*;
- b. Caracterizar e anotar os genes P5CS de *E. uniflora*, usando ferramentas de bioinformática;
- c. Caracterizar a estrutura gênica e proteica do gene P5CS de *E. uniflora* e comparar com a estrutura de genes P5CS de outras espécies de plantas;
- d. Verificar características fisiológicas de plantas de *E. uniflora* provenientes de ambientes contrastantes e submetidas a estresse por seca em ambiente controlado;
- e. Analisar o perfil de expressão do gene P5CS de *E. uniflora* sob condições de estresse por seca.

3 JUSTIFICATIVA

Vários esforços vêm sendo feitos em diferentes espécies para manipular o gene P5CS, com o objetivo de obter plantas que são capazes de crescer no deserto ou áreas de terras com excesso de salinidade (KISHOR et al., 1995; YOSHIBA et al., 1995; VERBRUGGEN; HERMANS, 2008; DELAUNEY; VERMA, 1993; HMIDA-SAYARI et al., 2005; XUE; LIU; HUA, 2009). Desta forma, estudar este gene em espécies que naturalmente ocorrem em ambientes inóspitos podem render informações importantes do ponto de vista do entendimento dos mecanismos de evolução adaptativa, bem como da aplicação biotecnológica destes genes. Além disso, o entendimento profundo sobre a evolução molecular destes genes em plantas é de extrema relevância para a compreensão dos mecanismos adaptativos e de tolerância às adversidades ambientais a que as plantas estão expostas. O presente estudo foi realizado para caracterizar o P5CS de *Eugenia uniflora* e investigar o possível papel dessa enzima no processo de adaptação dessa espécie.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Identificação e análise da sequência do gene P5CS de *Eugenia uniflora*

A identificação da sequência do gene P5CS de *E. uniflora* foi realizada baseada em buscas por blast (*basic local alignment search tool*) utilizando scripts de Perl entre o transcrito (GUZMAN et al., 2014) e um rascunho da primeira versão do genoma de *E. uniflora* (dados não publicados). A predição da estrutura do gene foi feita com o FGENESH, uma ferramenta online do SoftBerry (www.softberry.com), utilizando como modelo a espécie *Eucalyptus grandis*, que tem genoma sequenciado e anotado e também pertence a família Myrtaceae. A validação da sequência encontrada foi feita ancorando os *reads* (fragmentos curtos de sequências de DNA gerados a partir do sequenciamento) de uma biblioteca de RNAseq de folhas de *E. uniflora* na sequência predita usando o programa Bowtie (LANGMEAD et al., 2009). Para a visualização do ancoramento foi utilizado o programa Tablet (MILNE et al., 2009).

Sequências proteicas de P5CS de outras espécies de plantas foram obtidas no *NCBI Protein* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) para descobrir a relação filogenética de EuniP5CS com outros genes da mesma família. O alinhamento múltiplo da sequência proteica predita do P5CS de *E. uniflora* (EuniP5CS) e das sequências de P5CS selecionadas de outras espécies foi realizado com o programa *Muscle* (EDGAR, 2004). O alinhamento múltiplo foi manualmente analisado e editado e apenas posições alinhadas não ambíguas foram incluídas na análise filogenética. Após o alinhamento, foi realizada a reconstrução de uma árvore filogenética com as sequências do P5CS utilizando o método de máxima verossimilhança com o programa RAxML v8.2 (STAMATAKIS, 2014). O modelo de evolução utilizado nessa análise foi o modelo LG para a matriz de substituição de proteínas, escolhido a partir do programa *PartitionFinder 2* (LANFEAR et al., 2016). A análise foi rodada com um *bootstrap* de 500. A árvore foi visualizada e editada com o programa *FigTree* v1.4.3.

4.2 Plantas e condições do experimento

Sementes de *Eugenia uniflora* foram coletadas em regiões de Mata Ciliar no Rio Grande do Sul, Brasil e em regiões de Restinga no Rio de Janeiro, Brasil. Trinta plantas de cada região foram cultivadas em casa de vegetação com condições controladas localizadas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil). Três meses após a

germinação das plantas de *E. uniflora*, elas foram submetidas ao tratamento de estresse hídrico. Foram realizados três tratamentos: 5, 8 e 14 dias de escassez completa de água. Cada tratamento possuía um grupo controle onde as plantas receberam água normalmente a cada dois dias. Foram feitas quintuplicatas biológicas para cada tratamento e seu controle.

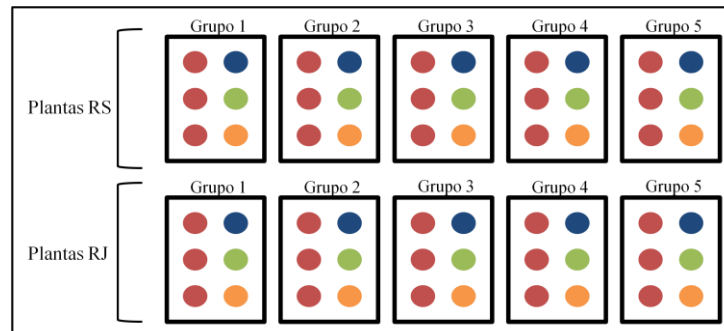


Figura 4. Esquema da distribuição das plantas durante o experimento de seca. Os círculos azuis representam as plantas submetidas ao primeiro tratamento de seca (5 dias), os círculos verdes ao segundo tratamento de seca (8 dias) e os círculos laranjas ao terceiro tratamento de seca (14 dias). Os círculos vermelhos representam as plantas controles de cada tratamento. A divisão em cinco grupos representa as replicatas biológicas.

4.3 Parâmetros Fisiológicos

No início do experimento (dia zero) todas as plantas do experimento foram pesadas em seus potes enquanto ainda estavam em condições de boa irrigação. Cada grupo de plantas também foi pesado ao final do seu respectivo tratamento de seca para avaliar e comparar a disponibilidade de água no solo. No dia 5 do experimento, a condutância estomática (g_{st}) de uma folha totalmente expandida e não murcha por planta, do respectivo grupo desse tratamento de seca, foi medida em estufa utilizando um porômetro em estado estacionário (Li-1600, Li-Cor Inc., Lincoln, NE). As medidas de condutância foram todas realizadas no mesmo horário. As plantas foram então levadas ao laboratório ao final do dia e tiveram seu potencial hídrico medido no início da manhã seguinte utilizando uma câmara de pressão do tipo Scolander (*Soil Moisture Equipment Corp.*, Series 300, Santa Bárbara, CA). As mesmas medidas foram realizadas no dia 8 e 14 do experimento nas plantas desses respectivos tratamentos de seca.

Os dados foram submetidos a uma análise estatística pela análise de variância (ANOVA), com $p < 0.05$, no programa SigmaPlot v11.0. Foram avaliadas as diferenças entre plantas controle e tratadas do mesmo ambiente, entre plantas controles da restinga e controles da mata ciliar e entre plantas tratadas da restinga e tratadas da mata ciliar, para dessa forma

não só obter informações a respeito das respostas ao estresse hídrico, mas também avaliar a resposta das plantas de acordo com o ambiente.

4.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

Folhas das plantas controle e tratadas de cada tratamento foram coletadas, colocadas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para posterior extração do RNA total. O RNA de folhas de plantas de *E. uniflora* de cada tratamento do estresse hídrico foi isolado para análises por RT-qPCR. Para a extração total do RNA, foi utilizada uma combinação do método CTAB (GAMBINO; PERRONE; GRIBAUDO, 2008) e o kit comercial Direct-zol™ (Zimo Research). Em resumo, aproximadamente 100 mg de cada amostra macerada em nitrogênio líquido foi utilizada para a extração. O tampão de extração (2% CTAB, 2.0% PVP-40, 2 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0 e 2% de β-mercaptoetanol adicionado antes do uso) foi aquecido a 65°C em banho-maria. Em cada amostra foi adicionado 800µL do tampão de extração e os tubos foram incubadas a 65°C por 10 minutos. O mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamil (24:1) foi adicionado em cada amostra e os tubos foram para a centrífuga a 7000 × g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo tubo e o mesmo volume recolhido foi adicionado de etanol 96%. Após essas etapas, seguiu-se com as etapas do protocolo do kit de extração (seguindo as instruções do fabricante). A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%.

A síntese de cDNA foi realizada com 1µg de mRNA purificado. Cada reação foi preparada com *primer* dT24V 1 µM (Alpha DNA, Montreal, QC, Canadá). Antes da transcrição, o RNA e o *primer* dT24V foram misturados com água isenta de RNAase até chegar no volume total de 10 µL e incubados a 70°C por 5 min para desnaturação, seguidas de transferência imediata para o gelo. As reações foram feitas com tampão 1X M-MLV RT, 0.5 mM dNTP (Ludwig, Porto Alegre, RS, Brasil) e 200 unidades da enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega, Madison, WI, EUA), em um volume final de 30 µL. A síntese de cDNA foi realizada a 40° C por 60 min em um Termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Todas as amostras de cDNA foram diluídas 100 vezes com água livre de RNase antes de serem usadas na análise de RT-qPCR.

4.5 Quantificação da expressão do gene EuniP5CS via PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Para validar e investigar a expressão do gene EuniP5CS no tecido das folhas foi realizado um RT-qPCR. Os *primers* para a amplificação da sequência do P5CS identificada no transcrito foram projetados utilizando o programa Primer 3 (UNTERGASSER et al., 2012): EuniP5CS_rt2F 5'-AGCTGTTCGAAGTGGGAATG-3' e EuniP5CS_rt2R 5'-TGCTGTCTGGAATAGCATCG-3'. A quantificação da expressão do gene EuniP5CS foi realizada via PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), utilizando o sistema de PCR em tempo real CFX384 *Real Time PCR system* (BioRad, Hercules, CA, EUA) com SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do protocolo do fabricante. As reações foram realizadas em um volume total de 10 μ L contendo 5 μ L de cDNA diluído (1:100), 0.2X SYBR Green I, 0.1 mM dNTP, 1X tampão de PCR, 3 mM MgCl₂, 0.25 U *Platinum Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 200 nM de cada *primer* (*reverse* e *forward*). As amostras foram analisadas com quintuplicata biológica e quadruplicata técnica em uma placa de 384 poços. Um controle sem amostra também foi incluído. As reações de PCR foram realizadas da seguinte forma: um passo inicial a 94°C durante 5min seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 15s, anelamento a 60°C durante 15s, extensão a 72°C durante 10s. A análise da curva de *melting* foi programada no final do PCR na faixa de 65 a 99°C e a temperatura aumentou 0.5°C a cada passo. O *threshold* e as linhas de base foram determinados manualmente utilizando o *software* gerenciador Bio-Rad CFX.

A quantificação do mRNA de EuniP5CS foi calculada utilizando o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O método $\Delta\Delta$ Ct quantifica a expressão de genes utilizando nos cálculos a expressão de genes de referência que possuem expressão invariável independente das condições e do local da expressão. A presença de genes de referência no cálculo permite a normalização, evitando diferenças de expressão devido a quantidades iniciais diferentes de amostra. Calculou-se inicialmente o Δ Ct de cada amostra, subtraindo os valores de Ct (*threshold cycle* ou limiar do ciclo) do gene de referência escolhido nesse estudo dos valores de Ct do gene EuniP5CS. O Ct é definido como o número de ciclos necessários para o sinal de fluorescência alcançar um limiar específico (delimitado na fase exponencial de amplificação de detecção) e inversamente correlacionado com a quantidade inicial do transcrito de interesse presente na reação (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Para calcular o $\Delta\Delta$ Ct utilizou-se a seguinte fórmula: $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct (amostra) - Δ Ct

(amostra normalizadora). Tendo o $\Delta\Delta Ct$, o valor da expressão gênica foi calculado da seguinte forma: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Dessa forma obteve-se as relações da expressão do gene EuniP5CS entre os controles e tratados de cada grupo do experimento. Todas as amostras possuíam quaduplicatas técnicas no RT-qPCR. A média dos valores para a expressão do gene EuniP5CS de cinco replicatas biológicas foram então calculadas. Para comparar as diferenças das expressões do EuniP5CS em cada grupo e se essas diferenças eram significativas, foi utilizado o teste t, ou teste t de Student. Os parâmetros da distribuição de duas colunas e duas amostras assumindo variâncias desiguais foram estabelecidos. As médias foram consideradas significativas quando $P < 0.05$.

4.6 Seleção dos genes de referência para análises de expressão por RT-qPCR

Seis genes de referência foram testados para esse experimento: β -Tubulina (TUB2), Glicerol-3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH), Ciclofilina (CYP), Ubiquitina Ligase E3 (E3), Histona H2A (H2A) e Histona H2B (H2B) (VANDESOMPELE, 2002; REBOUÇAS et al., 2013). A quantificação dos genes foi feita via RT-qPCR usando a mesma mistura de reação utilizada para o gene EuniP5CS, o mesmo método para a quantificação da expressão dos genes e as mesmas reações de PCR. A escolha dos melhores genes de referência para esse experimento foi feita utilizando o programa geNorm (MESTDAGH et al., 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização e análises da sequência EuniP5CS

A partir do genoma e do transcriptoma da *E. uniflora* foi possível identificar por meio de análises *in silico* uma sequência do gene P5CS em *E. uniflora*, nomeada de EuniP5CS. Embora a maioria das espécies de plantas em que o P5CS foi estudado apresentem dois genes P5CS nos seus genomas (TURCHETTO-ZOLET; MARGIS-PINHEIRO; MARGIS, 2009), espécies com apenas um gene também já foram reportadas, como é o caso da espécie *E. grandis*, a qual apresenta somente um gene P5CS assim como *E. uniflora*. Essa sequência do EuniP5CS encontrada apresenta um comprimento de 6745 pb e codifica uma proteína de 734 aminoácidos. A estrutura da sequência do gene possui 20 exons e 19 introns, a qual é conservada no gene de outras espécies de plantas (Figura 5). Análises com PFAM (<http://pfam.xfam.org/>) mostraram que a sequência EuniP5CS apresenta os domínios amino ácido kinase (PF00696 - *AA_kinase*) e a família aldeído desidrogenase (PF00171 - *Aldedh*) que são conhecidos por estarem conservados no P5CS de outras espécies (ZHOU et al., 2016).

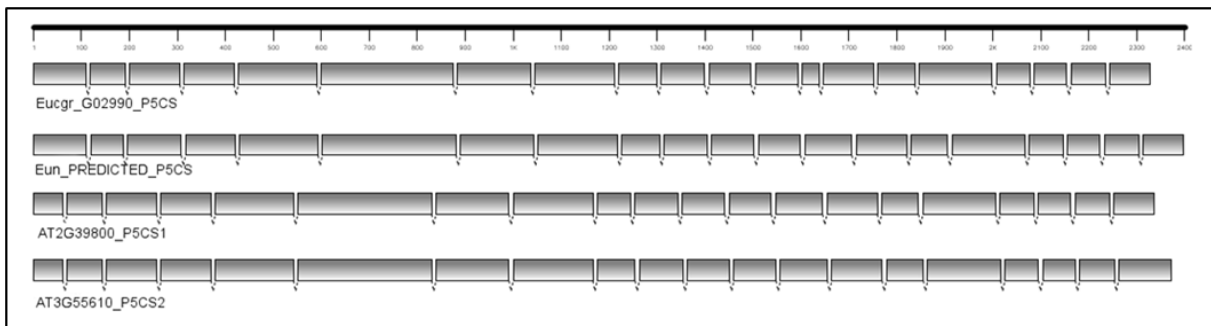


Figura 5. Estrutura gênica do P5CS. A estrutura gênica do P5CS é conservada entre as espécies. Na imagem os blocos em cinza correspondem aos éxons e o tamanho do bloco corresponde ao tamanho da sequência do éxon. As espécies *Eucalyptus grandis*, *Eugenia uniflora* e *Arabidopsis thaliana* (gene P5CS1 e P5CS2) apresentam 20 éxons e 19 introns.

Um alinhamento com poucas sequências de P5CS de plantas e o EuniP5CS foi realizado com o programa *Muscle* apenas para verificar a conservação dos aminoácidos entre as sequências. O alinhamento mostrou que as sequências de P5CS possuem uma estrutura conservada, com sítios de alta similaridade (Figura 6). Para entender a estrutura da sequência de aminoácido predita pelo EuniP5CS, um alinhamento múltiplo de sequências foi realizado com o programa *Muscle* com a sequência do gene P5CS de outras espécies de plantas obtidas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). O resultado da

relacionadas, ambas espécies pertencentes à família Myrtaceae. Além disso, um BLAST no NCBI com a sequência proteica do EuniP5CS mostrou como resultado o P5CS de *Eucalyptus grandis*, com uma identidade de 90%, *e-value* de 0 e cobertura de 100%.

Como uma enzima limitante, P5CS possui um papel importante na biossíntese de prolina. Nesse estudo, foi identificado e caracterizado o EuniP5CS, o primeiro gene P5CS obtido de *E. uniflora*, e seu envolvimento no estresse hídrico é discutido. O EuniP5CS apresentou as características de outros genes P5CS e também possui homologia e alta similaridade com as sequências de P5CS de outras espécies. Os domínios que o gene apresenta são conservados em vários organismos eucariotos e em alguns procaríotos.

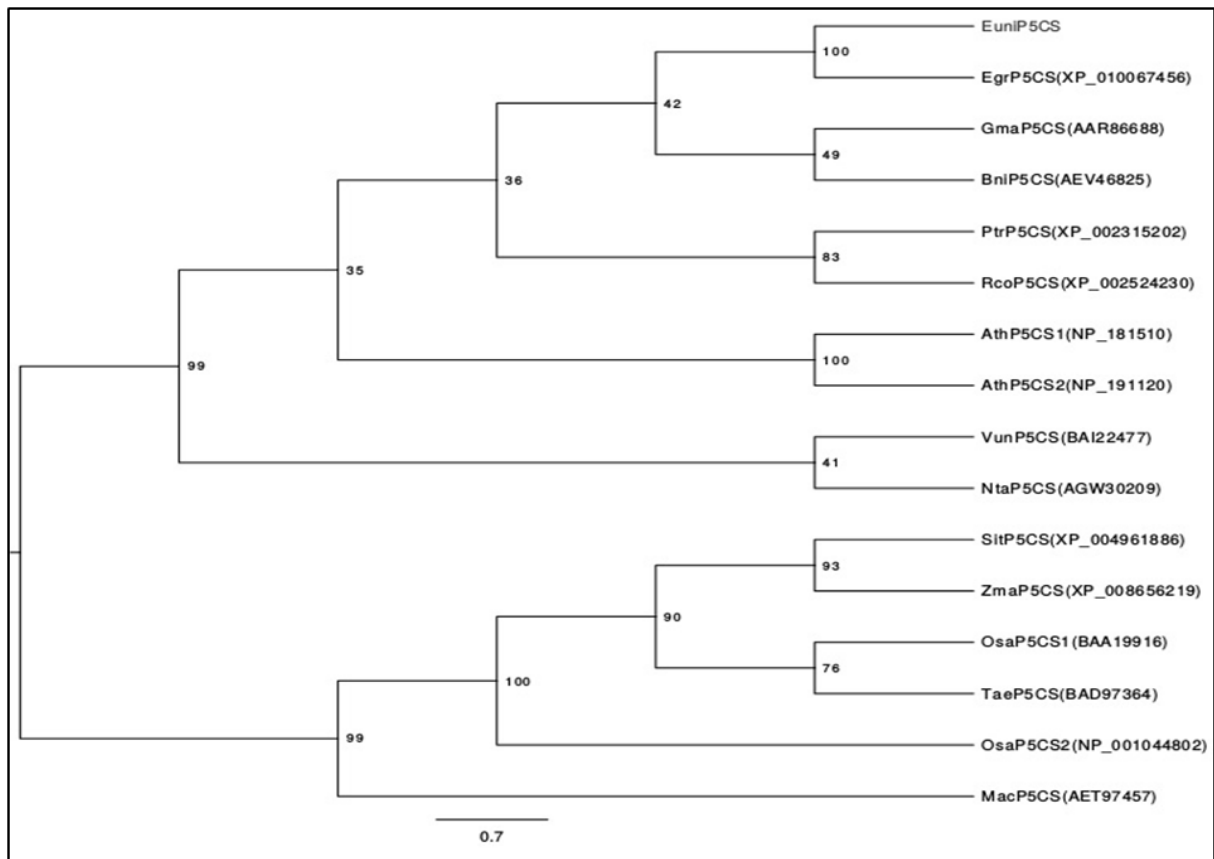


Figura 7. Árvore filogenética do gene EuniP5CS e de P5CSs de outras espécies. Relação filogenética do EuniP5CS com EgrP5CS (*Eucalyptus grandis* P5CS), GmaP5CS (*Glycine max* P5CS), BniP5CS (*Boehmeria nivea* P5CS), PtrP5CS (*Populus trichocarpa* P5CS), RcoP5CS (*Ricinus communis* P5CS), AthP5CS1 (*Arabidopsis thaliana* P5CS1), AthP5CS2 (*Arabidopsis thaliana* P5CS2), VunP5CS (*Vigna unguiculata* P5CS), NtaP5CS (*Nitraria tangutorum* P5CS), SitP5CS (*Setaria italica* P5CS), ZmaP5CS (*Zea mays* P5CS), OsaP5CS1 (*Oryza sativa* P5CS1), TaeP5CS (*Triticum aestivum* P5CS), OsaP5CS2 (*Oryza sativa* P5CS2) e MacP5CS (*Musa acuminata* P5CS). Números entre parênteses referem-se ao código de acesso das sequências no NCBI.

5.2 Análises dos parâmetros fisiológicos

5.2.1 Peso das plantas

As plantas do experimento foram pesadas em seus potes no início e ao final do experimento para avaliar a disponibilidade de água no solo. Como existiam 5 grupos de replicatas dentro de cada população, foi feita uma média dos 5 valores encontrados para cada tratamento e os resultados são mostrados na figura 8. No dia 0, todas as plantas apresentavam pesos semelhantes. No dia 5 do experimento, o peso de todas as plantas caiu, porém a partir desse dia as plantas controle de ambas as populações não apresentaram mais queda de peso, enquanto que as plantas sob estresse hídrico apresentaram.

Ao final do experimento, as plantas que passaram pelo estresse possuíam um peso menor comparado com as plantas controles. Essa diferença de peso provavelmente ocorreu devido à maior disponibilidade de água no solo das plantas controle e aos solos pobres em água das plantas tratadas. Dessa forma pode-se dizer que as plantas tratadas estavam de fato passando por um período de seca.

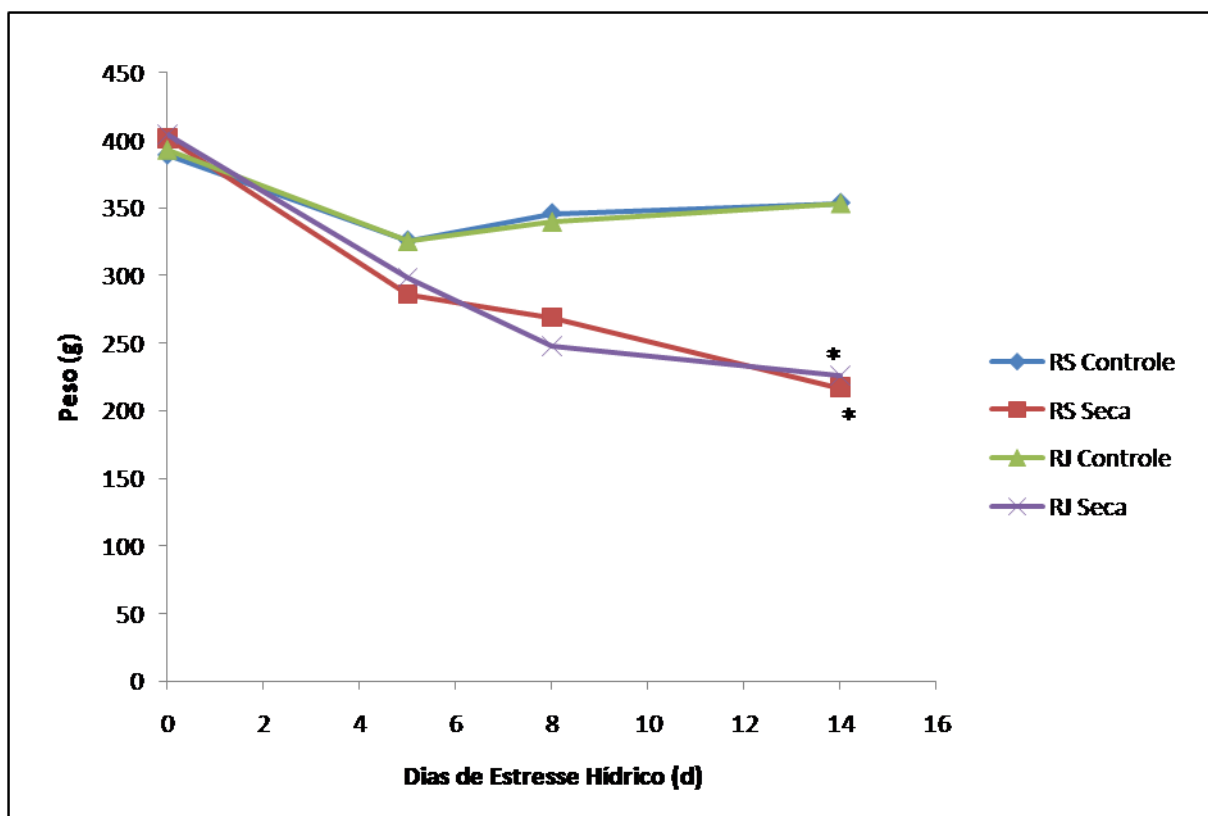


Figura 8. Peso das plantas inicial e final. O dia 0 representa o início do experimento, quando todas as plantas ainda estavam com boa irrigação. Os pesos dos dias 5, 8 e 14 são referentes às plantas ao final do respectivo tratamento. RS Controle e RJ Controle referem-se às plantas controle do experimento, enquanto que RS Seca e RJ Seca referem-se as plantas dos tratamentos de estresse hídrico. Os asteriscos indicam que existe diferença significativa entre os pesos de plantas controles e tratadas (seca) no dia 14 do experimento.

5.2.2 Condutância estomática

A condutância estomática das plantas do experimento foi avaliada a fim de verificar o comportamento dos estômatos durante o período de estresse hídrico. A condutância estomática para as plantas de *E. uniflora* está apresentada na figura 9. As plantas que passaram pelo período de seca por 5 dias e 8 dias não apresentaram diferenças significativas de condutância estomática entre plantas controles e tratadas. Além disso, não houve diferença entre as populações do Rio Grande do Sul (mata ciliar) e do Rio de Janeiro (restinga). Entretanto, aos 14 dias de estresse, as plantas tratadas, que passaram pelo período de estresse hídrico, apresentaram uma redução significativa na condutância estomática em relação às plantas controle desse período.

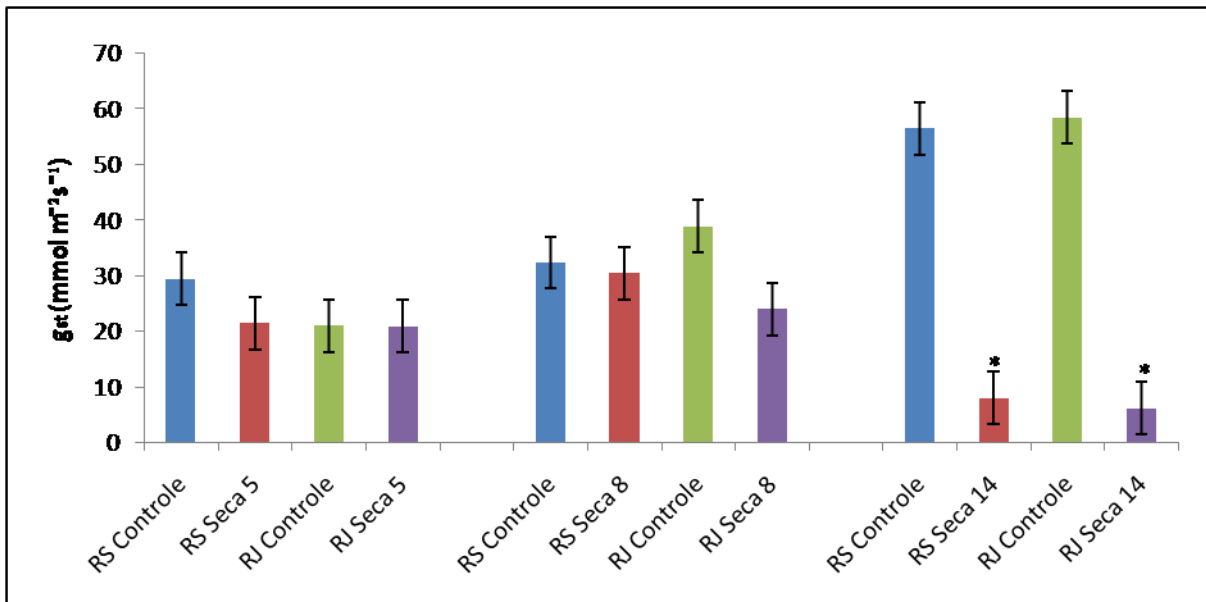


Figura 9. Condutância estomática das plantas durante o experimento. Os números 5, 8 e 14 que acompanham o nome RS Seca ou RJ Seca indicam os dias de tratamento do estresse hídrico. RS Controle e RJ Controle são referentes às plantas controle do experimento. Os asteriscos no gráfico indicam valores estatisticamente diferentes de condutância estomática entre plantas controle e tratadas (seca) no dia 14 do experimento.

Sabe-se que a perda de água muda a turgência das células guardas e modula o fechamento estomático (DE LACERDA, 2007). Além disso, em situações de baixa disponibilidade de água no solo, as plantas reduzem a perda de água ao reduzir a condutância estomática (FERNANDES DA COSTA; MARENCO, 2007). Dessa forma, pode-se dizer que as plantas tratadas estavam passando por um período de seca aos 14 dias do experimento devido à redução da condutância estomática. A temperatura, concentração de CO₂, intensidade luminosa e umidade do solo afetam a taxa de fotossíntese de plantas

(MARENCO; LOPES, 2005). A regulação da abertura e fechamento dos estômatos está relacionada com a intensidade de luz e o estado de hidratação das folhas, sendo o fechamento dos estômatos uma das primeiras respostas de plantas expostas a seca (AROCA, 2012). Dessa forma, plantas que passam por períodos de estresse hídrico, apresentam alterações no parâmetro de condutância estomática, podendo ele ser utilizado como indicador de deficiência de água (DE OLIVEIRA et al., 2004). Como a avaliação da expressão do gene EuniP5CS dependia que as plantas estivessem passando por um período de estresse, o parâmetro de condutância estomática foi importante como indicador de que as plantas tratadas estavam passando por um período de estresse hídrico.

5.2.3 Potencial hídrico

Medidas de potencial hídrico (Ψ) foram realizadas com as folhas das plantas do experimento. Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas dos potenciais hídricos das folhas durante o primeiro e segundo tratamento de seca (5 e 8 dias) entre plantas controle e tratadas e nem entre as populações. Apenas no terceiro período de seca, aos 14 dias de tratamento, foram encontradas diferenças entre plantas controle e tratadas (Figura 10).

A água está constantemente buscando um equilíbrio no sistema solo-planta-atmosfera, indo de acordo com a tendência de se mover de locais onde apresenta maior energia para aqueles onde o nível energético é menor (DE LACERDA, 2007). O potencial hídrico nada mais é que o potencial químico da água em um sistema, expresso em unidades de pressão. A bomba de pressão do tipo Scholander, utilizada nesse experimento, mede a pressão hidrostática negativa (tensão) que está presente no xilema das plantas. O xilema, que até então estava sob tensão, foi cortado para ser colocado dentro da coluna do equipamento e, nesse momento, a água foi puxada para dentro dos capilares do xilema. A câmara foi pressurizada com gás comprimido até que a água retornasse a superfície do corte. A pressão que aparecesse no manômetro nesse momento foi anotada e corresponde ao Ψ da folha que foi utilizado para construir o gráfico da figura 10.

O potencial hídrico indica o estado energético da folha e os valores de potencial explicam os fluxos de água no sistema solo-planta-atmosfera (BERGONCI et al., 2000). Quando a planta perde água e a taxa de absorção é menor que essa taxa de perda, o potencial hídrico da folha diminui (tendendo a se tornar mais negativo) podendo levar a redução da taxa de fotossíntese e fechamento dos estômatos (FERNANDES DA COSTA; MARENCO, 2007). Esses quadros podem ser encontrados principalmente durante períodos de seca (AROCA,

2012). Os resultados encontrados nesse experimento de seca estão de acordo com essa afirmação, pois quando o potencial hídrico estava muito negativo (no período de 14 dias de estresse), foi justamente quando a condutância estomática também estava reduzida, indicando o fechamento dos estômatos.

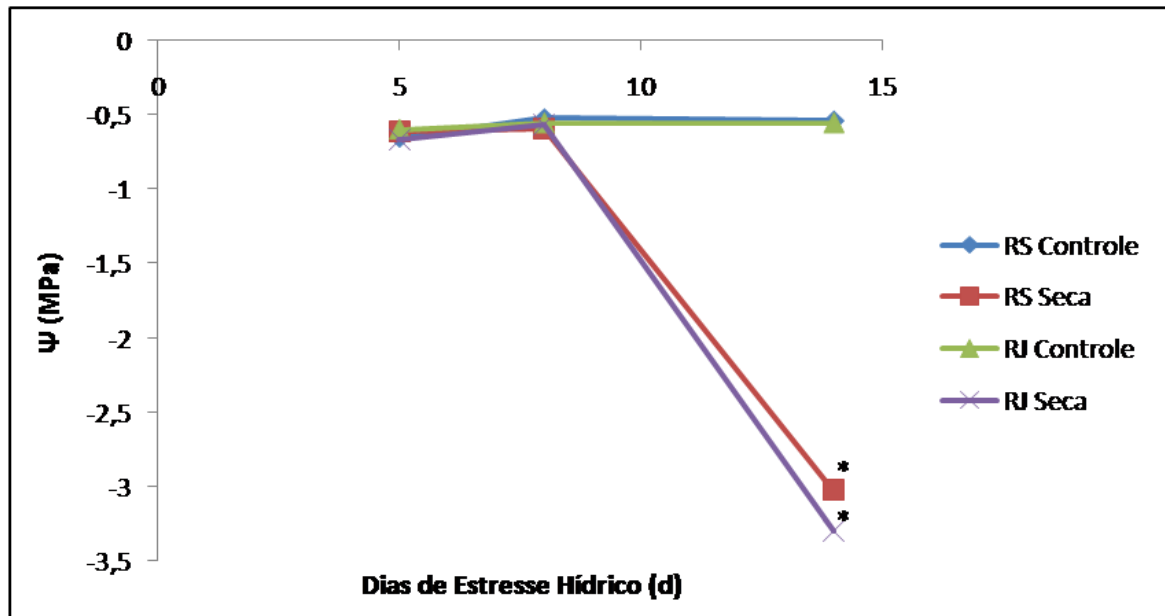


Figura 10. Potencial hídrico das plantas. RS controle e RJ Controle referem-se as plantas controle do experimento, enquanto que RS Seca e RJ Seca referem-se as plantas dos tratamentos de seca de 5, 8 e 14 dias. As medidas de potencial dos dias 5, 8 e 14 referem-se às plantas do respectivo tratamento. Os asteriscos no gráfico indicam valores estatisticamente diferentes de potencial hídrico entre plantas controle e tratadas (seca) no dia 14 do experimento.

5.3 Análise do padrão de expressão do gene P5CS de *E. uniflora* por RT-qPCR

5.3.1 Seleção de genes de referência

Para ser utilizado o método de quantificação de expressão gênica por RT-qPCR, foi necessário determinar inicialmente quais seriam os melhores genes para serem utilizados como referências nos cálculos para a normalização. Cada gene de referência foi testado em todas as condições do experimento para verificar quais apresentavam maior estabilidade na expressão durante os tratamentos. Após os cálculos de expressão relativa com os resultados do RT-qPCR, as médias dos valores foram inseridas no programa geNorm. Como resultado, o geNorm estabeleceu que os genes H2A e E3 são os genes que menos variaram a expressão nas folhas das plantas de *E. uniflora* nas condições do experimento de estresse hídrico, sendo

eles os melhores genes para serem utilizados como genes de referência nos cálculos de expressão do gene EuniP5CS (Figura 11).

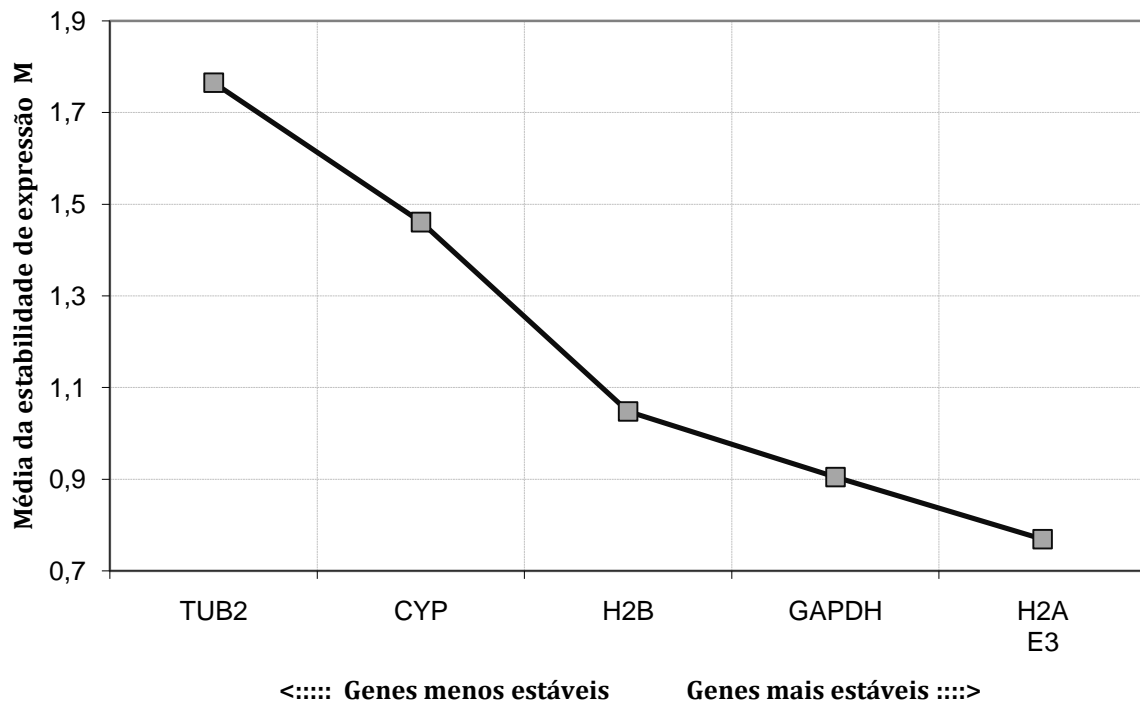


Figura 11. Valores das médias de estabilidade de expressão (M) dos candidatos a genes de referência após análises do geNorm. Os valores de M mais baixos dos genes H2A (Histona H2A) e E3 (Ubiquitina Ligase E3) indicam que eles têm a expressão mais estável nas folhas de *Eugenia uniflora*. TUB2 (β -Tubulina), CYP (Ciclofilina), H2B (Histona H2B) e GAPDH (Glicerol-3-Fosfato Desidrogenase).

5.3.2 Perfil de expressão do EuniP5CS em condições de estresse hídrico

Para verificar se os genótipos das plantas provenientes da restinga e da mata ciliar apresentavam alguma diferença de expressão do gene EuniP5CS antes de iniciar o experimento de estresse hídrico, foram comparadas as expressões do gene nos controles das plantas desses ambientes utilizando as medidas do nível de mRNA do EuniP5CS obtidas pelo RT-qPCR. Os genes Ubiquitina Ligase E3 (E3) e Histona H2A (H2A) foram utilizados como genes de referência para os cálculos da expressão do EuniP5CS, observados nesse estudo como sendo os normalizadores ideais para folhas de *E. uniflora* pela análise do geNorm.

As análises estatísticas demonstraram que existem diferenças de expressão do P5CS entre plantas controles provenientes da restinga e plantas controle provenientes da mata ciliar: EuniP5CS das plantas provenientes do ambiente de Mata Ciliar no Rio Grande do Sul apresentaram maior expressão do que o EuniP5CS das plantas provenientes da restinga do Rio de Janeiro (Figura 12). Esse resultado pode estar relacionado com algum mecanismo de

adaptação das plantas de mata ciliar que interfere na regulação da expressão do gene. São necessários mais estudos para identificar possíveis reguladores da expressão do gene.

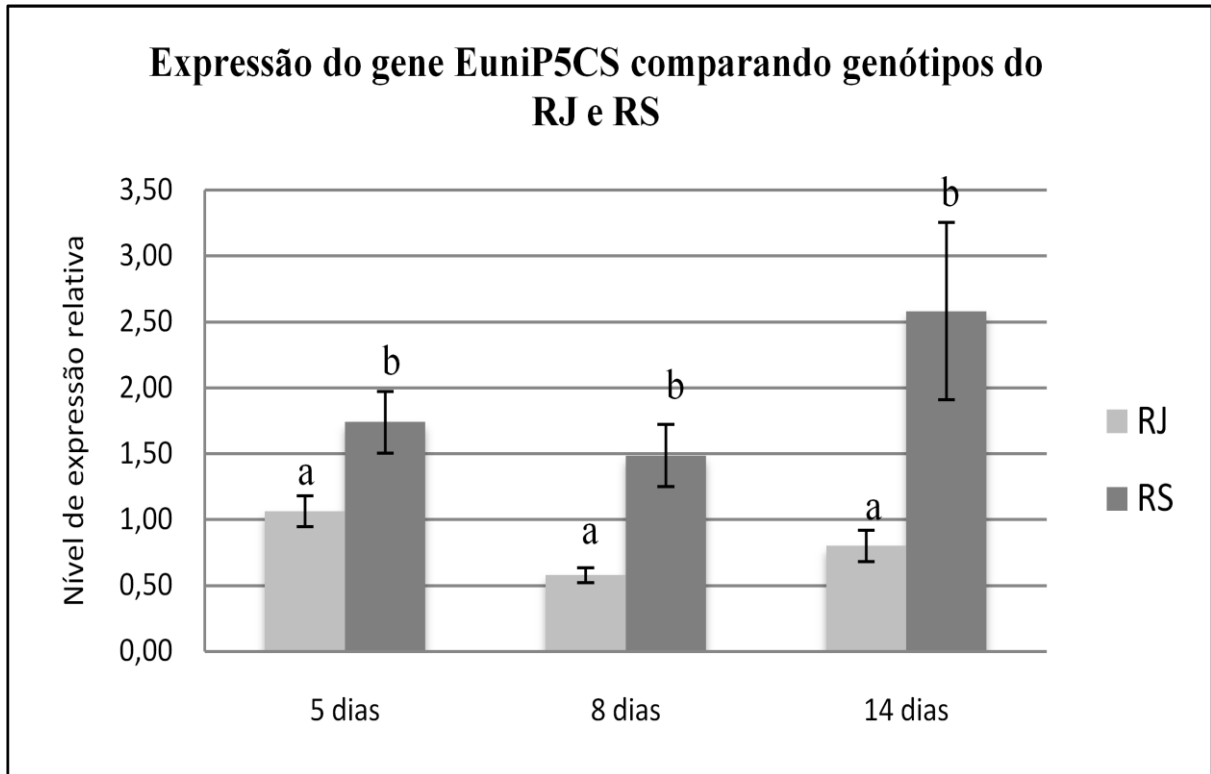


Figura 12. Análise por RT-qPCR da expressão do gene EuniP5CS nas plantas controle do RJ e RS. Níveis de expressão do gene EuniP5CS de plantas controle dos genótipos do RJ e RS. Em todas as plantas controle, a expressão do EuniP5CS foi significativamente maior nas plantas da região de mata ciliar (RS). As plantas controle estão separadas em três tempos apenas como forma de replicata do resultado.

Para analisar se o nível de expressão do gene EuniP5CS sofre alterações durante o estresse hídrico, foi medido o nível de mRNA do EuniP5CS, durante o experimento de estresse hídrico, por meio do RT-qPCR. Como mostra a figura 13 (A e B), os níveis de expressão durante o estresse variam conforme o genótipo. As plantas provenientes de ambientes de restinga (amostras da praia de Grumari, Rio de Janeiro) apresentam diferenças significativas da expressão do gene EuniP5CS entre plantas controle e tratadas durante os dois primeiros tratamentos de seca (5 dias e 8 dias de estresse), sendo que as plantas tratadas apresentam maior expressão do gene EuniP5CS. Apenas no último tratamento, aos 14 dias de estresse, é que não existe diferença significativa, fato que pode ser atribuído ao valor de desvio padrão alto (Figura 13, A). Já as plantas provenientes de ambiente de mata ciliar (amostras do RS), apenas no primeiro tratamento de seca, aos 5 dias de estresse, possuem diferenças significativas da expressão do gene, com expressão menor do gene EuniP5CS nas plantas tratadas (Figura 13, B). Essa menor expressão nas plantas tratadas pode ter ocorrido

devido a maior expressão do EuniP5CS encontradas no genótipo das plantas controle do RS comparadas com o genótipo do RJ. Dessa forma, por possuir maior expressão antes de iniciar o estresse hídrico, elas poderiam já possuir um mecanismo de adaptação, não sendo necessário aumentar a expressão do gene EuniP5CS.

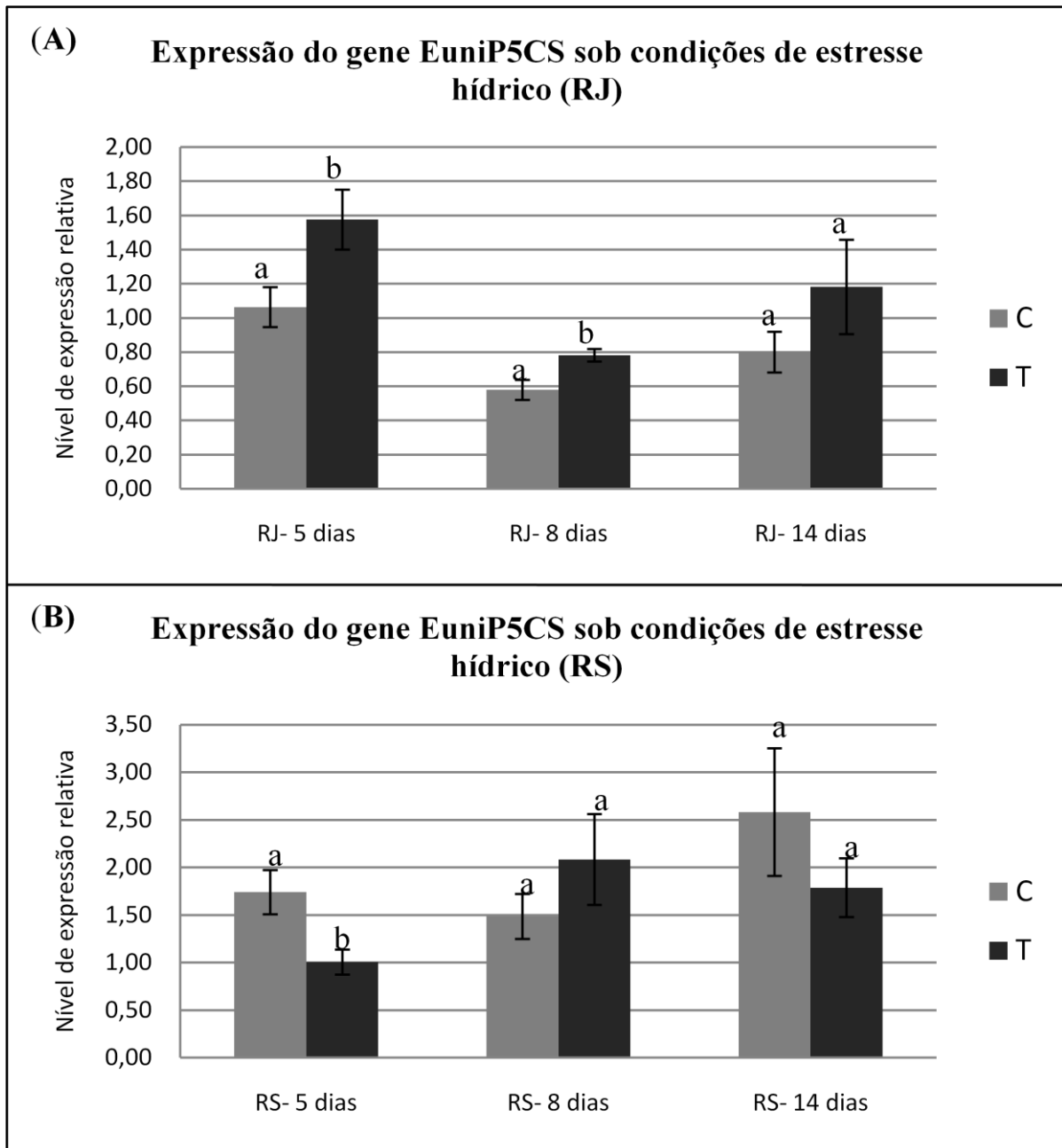


Figura 13. Análises por RT-qPCR da expressão do gene EuniP5CS durante os períodos do estresse hídrico. (A) Níveis de expressão do gene EuniP5CS de plantas do RJ (Restinga) sob condições de estresse hídrico. A expressão do EuniP5CS aumentou nas plantas tratadas do RJ nos dias 5 e 8 do experimento comparado com as plantas controle. (B) Níveis de expressão do gene EuniP5CS de plantas do RS (Mata Ciliar) sob condições de estresse hídrico. A expressão do EuniP5CS é menor nas plantas tratadas do RS comparado com as plantas controle no dia 5 do experimento. Os níveis de expressão foram calculados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (Livak & Schmittgen, 2001). O nível de transcritos acumulados nas plantas são relatados por expressão de quatro replicatas técnicas e cinco repláticas biológicas. A letra C indica as plantas controle e a letra T as plantas tratadas (seca).

As plantas de restinga podem ter aumentado a expressão do EuniP5CS durante o estresse hídrico por pertencerem ao genótipo que nas plantas controle possuíam menor expressão do gene. Os valores de expressão do gene são variáveis mesmo entre grupos de replicatas biológicas, o que pode ter ocasionado os desvios padrões altos, podem ter acontecido pelo fato da *Eugenia uniflora* ser uma planta nativa e não um cultivar.

O acúmulo do aminoácido prolina em plantas induzido por estresses abióticos já foi observado em muitas espécies (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008) e o nível de prolina acumulado em plantas está correlacionado com o aumento da expressão do gene P5CS, principalmente em respostas a estresses hídricos e salinos (ZHOU et al., 2016)(CHEN et al., 2009). Baseado nas análises de RT-qPCR desse experimento, é possível verificar que a expressão do EuniP5CS responde a estresses hídricos nas plantas de restinga, podendo estar relacionada a tolerância da *Eugenia uniflora* a ambientes como o de restinga, devido ao possível acúmulo de prolina após o aumento da expressão do EuniP5CS. Entretanto, a função precisa do gene EuniP5CS e a proteína codificada em resposta ao estresse ainda não é bem compreendida. Estudos futuros do gene P5CS em *Eugenia uniflora* e de possíveis mecanismos regulatórios do gene serão importantes para o entendimento do papel do gene e da tolerância a estresses relacionado a prolina nessa espécie bem como para melhor entender os possível envolvimento desse gene em processos de adaptação local dessa espécie.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nesse estudo, foi identificado um gene P5CS em *Eugenia uniflora* (EuniP5CS), o qual foi caracterizado quanto a sua estrutura e relacionamento filogenético. A expressão do gene EuniP5CS sob estresse hídrico foi quantificada por RT-qPCR. Os resultados mostraram que o EuniP5CS é um membro da família do P5CS e possui alta similaridade com outras sequências de P5CS de outras espécies. A expressão do EuniP5CS nas folhas está regulada durante o estresse nas plantas no RJ, indicando um possível fator importante para a resistência de *Eugenia uniflora* a estresses abióticos, principalmente ao estresse hídrico. Entretanto, a função precisa do gene EuniP5CS e a correlação com o acúmulo de prolina ainda precisa ser melhor estudada, assim como possíveis mecanismos de regulação da expressão do gene como, por exemplo, microRNAs. Esforços para investigar os mecanismos moleculares de adaptação a estresses em *Eugenia uniflora*, entre eles o papel do gene P5CS, são fundamentais para entender os mecanismos de adaptação dessa espécie a ambientes tão contrastantes como o de restinga e mata ciliar.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, D. J.; FARIA, M. V.; SILVA, P. R.. Biologia experimental em Pitangueira: uma revisão de cinco décadas de publicações científicas. **Ambiência Guarapuava** (PR), v. 8, n. 1, p. 177-193, 2012.

ARAÚJO, D. S. D. et al. Comunidades vegetais do Parque Nacional da Restinga de Jurujuba. Esteves F. A. (Ed) **Ecologia das lagoas costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurujuba e do Município de Macaé (RJ)**, Rio de Janeiro, NUPEM/UFRJ, p. 39–62, 1998.

AROCA, Ricardo. **Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features**. Aroca, R. (Ed.), 2012.

ASHRAF, M. et al. Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. **Advances in Agronomy**, v. 111, p. 249-296, 2011.

BARROSO, G. M.; MARQUES, M. C. M. Myrtaceae. Marques, M. C. M.; Vaz, A. S. F.; Marquete, R. (Orgs). **Flórua da APA Cairuçu, Parati, RJ: espécies vasculares**. Rio de Janeiro, Série Estudos e Contribuições, JBRJ, v. 14, p. 314–382, 1997.

BERGONCI, J. I. et al. Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 8, p. 1531-1540, 2000.

BEZERRA, J. E. F. et al. Propagação de genótipos de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) pelo método de enxertia de garfagem no topo em fenda cheia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.160-162, 2002.

BEZERRA, J. E. F.; SILVA JUNIOR, J. F.; LEDERMAN, I.E. Melhoramento genético e o manejo da pitangueira em Pernambuco. **IV SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, III ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL**. Palestras & Resumos. (Ed) REISSER JÚNIOR, C. et al. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 85-93, 2008.

CAO, Li et al. Isolation and characterization of pyrroline-5-carboxylate synthetase gene from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, p. 1-9, 2015.

CHEN, J. B. et al. Cloning the PvP5CS gene from common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its expression patterns under abiotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 1, p. 12–19, 2009.

CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A; ZHU, J. K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**, v. 45, n. 2, p. 437–448, 2005.

CHOUDHARY, N. L.; SAIRAM, R. K.; TYAGI, A. Expression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.). **Indian journal of biochemistry & biophysics**, v. 42, n. 6, p. 366–370, 2005.

COSTA, A. G. V. et al. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n.2, p. 539-549, 2013.

DE LACERDA, C. F.. **Relações solo-água-plantas em ambientes naturais e agrícolas do nordeste brasileiro**. Recife: UFRP, 2007.

DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, v. 4, p. 215–223, 1993.

DE OLIVEIRA, A. D. et al. Condutância estomática como indicador de estresse hídrico em feijão. **Engenharia Agrícola**, v. 25, n. 1, p. 86–95, 2004.

DILLENBURG, L. R.; WAECHTER, J. L.; PORTO, M. L. Species composition and structure of a sandy coastal plain forest in northern Rio Grande do Sul, Brazil. U. Seeliger (Org.). **Coastal Plant Communities of Latin America**. Academic Press, p. 349–366, 1993.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

FARZANEH, M.; JAZI, F. R.; MOTAMED, N. Application of dot blotting for detecting the expression of p5cs gene in transgenic olive plant-lets. **Febs Journal**, v. 272, p. 547, 2005.

FERNANDES DA COSTA, G.; MARENCO, R. A. Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*). **Acta Amazonica**, v. 37, n. 2, p. 229–234, 2007.

FILIPPOU, Panagiota et al. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 97, p. 1–10, 2014.

GAMBINO, G.; PERRONE, I.; GRIBAUDO, A. Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. **Phytochemistry, Anal.:** PCA 19, p. 520–525, 2008.

GINZBERG, Idit et al. Isolation and characterization of two different cDNAs of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. **Plant Mol Biol**, v. 38, p. 755–764, 1998.

GUAN, Chunfeng et al. A *Lycium chinense*-derived P5CS-like gene is regulated by water deficit-induced endogenous abscisic acid and overexpression of this gene enhances tolerance to water deficit stress in *Arabidopsis*. **Molecular Breeding**, v. 34, n. 3, p. 1109–1124, 2014.

GUZMAN, Frank et al. De novo assembly of *Eugenia uniflora* L. transcriptome and identification of genes from the terpenoid biosynthesis pathway. **Plant Science**, v. 229, p. 238–246, 2014.

HMIDA-SAYARI, Aïda. et al. Overexpression of 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science**, v. 169, p. 746–752, 2005.

HU, C. A.; DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 19, p. 9354–8, 1992.

IGARASHI, Yumico. et al. Characterization of the gene for delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. **Plant molecular biology**, v. 33, n. 5, p. 857–65, 1997.

KISHOR, P. B. K. et al. Overexpression of Delta-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants. **Plant Physiology**, v. 108, n. 4, p. 1387–1394, 1995.

LANFEAR, Robert et al. PartitionFinder 2 : New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 3, p. 772-773, 2017.

LANGMEAD, Ben et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, v. 10, n. 3, p. R25, 2009.

- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- MAGGIO, Albino et al. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? **Plant Journal**, v. 31, n. 6, p. 699–712, 2002.
- MAHAN, M. J.; CSONKA, L. N. Genetic analysis of the proBA genes of *Salmonella typhimurium*: Physical and genetic analyses of the cloned proB+ A+ genes of *Escherichia coli* and of a mutant allele that confers proline overproduction and enhanced osmotolerance. **Journal of Bacteriology**, v. 156, n. 3, p. 1249–1262, 1983.
- MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia Vegetal: Fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Viçosa, MG, Editora UFV, 2005.
- MARGIS, Rogerio et al. Genetic differentiation among three neighboring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) populations within the Brazilian Atlantic rain forest. **Biodiversity & Conservation**, v. 11, n. 1, p. 149–163, 2002.
- MARIJUAN, M.P.; BOSCH, S.M. Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in Plant Science**, v. 18, p. 660-666, 2013.
- MATYSIK, J. et al. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **Current Science**, v. 82, n. 5, p. 525–532, 2002.
- MESTDAGH, Pieter et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. **Genome Biology**, v. 10, n. 6, p. R64, 2009.
- MICKELBART, M. V.; HASEGAWA, Paul M.; BAILEY-SERRES, Julia. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 4, p. 237–251, 2015.
- MILNE, Iain et al. Tablet-next generation sequence assembly visualization. **Bioinformatics**, v. 26, n. 3, p. 401–402, 2009.
- MOLINARI, H. B. C. et al. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock *Carrizo citrange* (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v. 167, n. 6, p. 1375–1381, 2004.

ORSER, C. S. et al. The *Escherichia coli* proB gene corrects the proline auxotrophy of *Saccharomyces cerevisiae* pro1 mutants. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 212, n. 1, p. 124–128, 1988.

PENG, Z.; LU, Q.; VERMA, D. P. S. Reciprocal regulation of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. **Molecular and General Genetics**, v. 253, n. 3, p. 334–341, 1996.

RAMADAN, A. M.; HASSANEIN, S. E. Characterization of P5CS gene in *Calotropis procera* plant from the de novo assembled transcriptome contigs of the high-throughput sequencing dataset. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 337, n. 12, p. 683–690, 2014.

REBOUÇAS, E. L. et al. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 1, p. 143-154, 2013.

RODRIGUES, R. R.; NAVE, A. G. Heterogeneidade Florística das Matas Ciliares. **Matas Ciliares: conservação e recuperação**. São Paulo, EDUSP., p. 45–71, 2000.

ROTMAN, A.D. Las especies argentinas del género *Eugenia* (Myrtaceae). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 31, n. 1-2, p. 69-93, 1995.

SALGUEIRO, Fabiano. et al. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. **Diversity and Distributions**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 201-210, 2004.

SCARANO, F. R.. Plant communities at the periphery of the Atlantic rain forest: Rare-species bias and its risks for conservation. **Biological Conservation**, v. 12, n. 6, p. 1201-1208, 2009.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SEKI, Motoaki et al. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. Current Opinion in **Plant Biology**, v. 10, n. 3, p. 296-302, 2007.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal Of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 221-227, 2007.

SILVA-ORTEGA, C. O. et al. Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. **Plant Physiol Biochem**, v. 46, p. 82–92, 2008.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, n. 4, p. 1057–1060, 1989.

STAMATAKIS, Alexandros. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312–1313, 2014.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A.. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 2, p. 89–97, 2010.

TOSCANO, Stefania et al. Physiological and Biochemical Responses in Two Ornamental Shrubs to Drought Stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. Phylogeography and ecological niche modelling in *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) suggest distinct vegetational responses to climate change between the southern and the northern Atlantic Forest. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 182, n. 3, p. 670–688, 2016.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R.. The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: A key enzyme in proline synthesis. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 281, n. 1, p. 87–97, 2009.

UNTERGASSER, Andreas et al. Primer3-new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. 1–12, 2012.

VANDESOMPELE, Jo et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, RESEARCH0034, 2002.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: A review. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, p. 753–759, 2008.

VERSLUES, P. E. et al. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **Plant Journal**, v. 45, n. 4, p. 523–539, 2006.

WANG, Le et al. Characterization of LhSorP5CS, a gene catalyzing proline synthesis in

Oriental hybrid lily Sorbonne: molecular modelling and expression analysis. **Botanical Studies**, v. 58, n. 1, 2017.

WANG, W. X. et al. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. **Acta Hort**, v. 560, p. 285–292, 2001.

YOSHIBA, Yoshu et al. Correlation between the induction of a gene for Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. **The Plant Journal**, v. 7, n. 5, p. 751–760, 1995.

XUE, X.; LIU, A.; HUA, X. Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus*. **BMB reports**, v. 42, p. 28–34, 2009.

ZHOU, Hong et al.. Cloning and sequence analysis of the Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthase gene (MP5CS) from mulberry (*Morus alba*) and patterns of MP5CS gene expression under abiotic stress conditions. **The Journal Of Horticultural Science And Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 100–108, 2016.

ZHUANG, Guo-Qing et al. Molecular cloning and characterization of P5CS gene from *Jatropha curcas* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 66, p. 14803–14811, 2011.